DOI:10.11931/guihaia.gxzw201805035

酵母菌促进铅和镉胁迫下麻疯树生长的研究

方志荣[1, 2,3]，徐 莺[1]，刘 庆[3],陈 放[1*]

（1. 四川大学生命科学学院,成都 610064;2. 西昌学院资源与环境学院,西昌，四川 615013; 3. 中国科学院成都生物研究所,成都 610041）

摘要：筛选对铅和镉具有抗性和吸附性的酵母菌，构建麻疯树根系-酵母菌联合修复体系，促进高浓度铅和镉胁迫下麻疯树的生长，对于提高麻疯树对铅、镉污染土壤效率具有重要的意义。该研究分别从麻疯树的根段、珙桐的茎段、珙桐的根段分离到 3 株具有铅、镉抗性的酵母菌，命名为 Jc、Di1、Di2,并测定了三者对铅、镉的抗性和吸附性。将筛选出的 2 株能吸附铅、镉的酵母菌菌株接种麻疯树幼苗，研究接种 2 种酵母菌的麻疯树植株对铅、镉胁迫的响应。结果表明：经形态学和生理生化特征观察，Jc 初步鉴定红酵母属（*Rhodotorula* sp.），Di1 为假丝酵母属(*Candida* sp.），Di2 为德巴利酵母属(*Debaryomyces* sp.）。三种酵母菌对铅、镉都有一定的抗性，其抗性能力的大小为 Jc>Di2>Di1。Di1 和 Jc 对铅和镉都具有一定的吸附性将其用于接种麻疯树幼苗。与不接种酵母菌(ck)的麻疯树植株相比，接种 Di1 和 Jc 的麻疯树植株在根、茎、叶、全株干重方面显著增加，叶绿素、全株氮、全株磷浓度显著增加，SOD、POD、CAT 的活性提高，MDA 浓度显著下降。从综合接种效应来看：Jc、Di1 作为铅、镉的钝化剂，是铅、镉胁迫下促进麻疯树生长的备选菌株。

关键词：内生酵母菌，铅和镉抗性的酵母菌，促生效应，植物修复，麻疯树

中图分类号：Q945.78　　**文献标志码**：A

Plant growth-promoting traits of yeasts on *Jatropha curcas* under lead and cadmium stress

FANG Zhirong[1,2,3], XU Ying[1], LIU Qin[3],CHEN Fang[1]*

(1. *College of Life Sciences, Sichuan University*, Chengdu 610064, China

2. *Resources and Environment School of Xichang College*, Xichang 615013, Sichuan, China

3. *Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences*, Chengdu 610041, China)

Abstract: Screening yeasts with resistance and adsorption to lead and cadmium, and constructing a *Jatropha curcas* root-yeast phytoremediation system, promoting the growth of *Jatropha curcas* under high concentration of lead and cadmium stress were very important to improve phytoremediation efficiency of lead and cadmium contaminated soil by *Jatropha curcas*. In this study, three endophytic yeasts with lead and cadmium resistance were isolated by surface-sterilized methods from the healthy *J. curcas* root, *Davidia involucrata* stem, *D. involucrata* root, named as Jc, Di1, Di2. The isolate was identified as *Rhodotorula* sp., *Candida* sp., *Debaryomyces* sp. based on morphologic, physiological and biochemical characteristics. They could grow on the PDA medium with a concentration of 500 mg Ł$^{-1}$ $Pb(NO_2)_2$ or 50 mg Ł$^{-1}$ $CdCl_2.2.5H_2O$. *Rhodotorula* sp. (Jc) and *Candida* sp. (Di1) yeasts with adsorb ability of lead and cadmium were used to inoculate *J. curcas* seedling to study effects on the growth of *J. curcas* under cadmium and lead stress ; physiological characteristics, antioxidase

基金项目：国家科技支撑计划(2011BAD22B08)，四川省科技计划项目（2011HH0006）[Supported by National “12th Five-Year” Science and Technology Support project(2011BAD22B08); Sichuan International Science and Technology Cooperation project (2011HH0 006)]。

作者简介：方志荣(1981-)，女，四川冕宁人，博士，讲师，主要从事植物生理学方向的研究，（Email）172580110@qq.com。

***通信作者**：陈放，博士，教授，研究方向为植物学，(E-mail) cfang@263.net。

of *J. curcas* seedlings inoculated yeasts under lead and cadmium stress were also measured. The dry weights of *J. curcas* roots, shoots, leaves and whole plants showed a significant increase when the *Rhodotorula* sp. (Jc) and *Candida* sp. (Di1) yeasts was inoculated compared with non-inoculated control plants. The plant growth-promoting effects of *Rhodotorula* sp. Jc and *Candida* sp. Di1 yeasts could be attributed to decreasing concentration of lead and cadmium in root ,shoot and leaf ; increasing activities of POD, SOD and CAT and concentration of chlorophyll, as well as concentration of nitrogen, phosphate in whole plant. So *Rhodotorula* sp. (Jc) and *Candida* sp. (Di1) yeasts may act as passivator of lead and cadmium to promote the growth of *J. curcas* under lead and cadmium stress.

Keywords: endophytic yeast, lead and cadmium resistance yeasts, growth-promoting effect, phytoremediation, *Jatropha curcas*

铅和镉是农业和工业活动中释放到环境中的两种最常见的重金属污染物，可对植物造成毒性效应影响植物的生长发育，也可通过生物链进入人体，对人体造成伤害，因此铅和镉污染引起了世界的广泛关注（Wong & Selvam,2006；Tchounwou et al., 2012）。污染土壤的植物修复技术与传统的化学、物理修复技术相比，具有非破坏性、安全性、原位性、无二次污染和经济性等优点，在污染土壤修复方面具有广阔的前景。成功的植物修复需要植物具有多种特征，如能生长在重金属污染土地上，快速生长，具有高的生物量，能在易于收获的部分累积重金属等（Bhargava，2012）。

麻疯树（*Jatropha curcas*）为大戟科麻疯树属植物，是一种分布于美洲、非洲和亚洲热带和亚热带地区的多用途抗旱落叶多年生灌木。麻疯树种子含有 30%~35％的油，可以转化为优质和环保的生物柴油，是一种极具潜能的能源作物（Foidl et al.,1996）。此外，许多的研究已经证明麻疯树是一种极好的环境修复植物材料，可用于铅和镉污染土壤的修复（Pandey et al., 2016; Jamil et al.,2009; Mangkoedihardjo, 2008）。然而，高浓度的铅和镉将降低麻疯树生长的速度，减少地上部分的生物量（Liang et al., 2012），这将降低麻疯树的修复效率，并限制了其在环境修复中的应用。

重金属的微生物修复技术是一种利用微生物代谢功能固定重金属离子或将有毒的重金属离子转化成无毒或低毒状态的修复技术，但是由于利用微生物去除土壤重金属的难度大，因而单一应用微生物修复技术的应用范围也受到限制（李韵诗等，2015）。在土壤微生态系统中，植物与根际微生物的作用功能可以结合在一起，由此而建立的植物-微生物联合修复体系，可发挥二者的优势，提高重金属污染土壤的修复效率（李韵诗等，2015）。酵母菌是一类无性繁殖以出芽繁殖为主的单细胞真菌。一些来源于根际和根际周围土壤中的酵母菌如 *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichospron*, *Williosis* 和 *Yarrowia* 能促进植物的生长（Cloeteet al.，2009）。此外，一些来源于植物体内的酵母菌 *Williopsis saturnus*, *Rhodotorula graminis* 能产生生长素，促进植物的生长（Nassar et al.,2005；Xin et al., 2009）。Deng et al.(2012)报道了一株对 Cu、Zn、Pb 和 Cd 具有抗性的内生酵母菌株 Cryptococcus sp. CBSB78 能促进 *Brassica alboglabra* 在 Zn、Pb 和 Cd 胁迫下的生长。因此，筛选出既对铅、镉具有抗性，又能促进麻疯树生长的酵母菌，对于构建麻疯树-微生物修复体系提高麻疯树对铅、镉污染土壤的修复效率具有重要的意义。该研究通过从胁迫环境下生长的植株内分离具有铅、镉抗性的酵母菌，测定其对铅和镉的吸附能力，并将具有铅、镉吸附性的酵母菌接种麻疯树幼苗，观察其对麻疯树生长的影响，筛选出能促进麻疯树生长的酵母菌菌株，并探讨其促生机理，以期为构建麻疯树-酵母菌联合修复体系提高麻疯树的修复效率提供理论基础和实践用的酵母菌菌株。

1 材料与方法

1.1 铅、镉吸附菌的筛选、鉴定、抗性测定

1.1.1　试验用培养基

1、分离纯化培养基：马铃薯葡萄糖琼脂培养基（potato dextrose agar，PDA）：马铃薯(去皮)200 g，葡萄糖20 g，琼脂粉20 g，纯化水1000 mL。

2、筛选培养基：以PDA培养基为基础培养基，在培养基中加入50 mg·L^{-1}的$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$和500 mg·L^{-1}的$Pb(NO_2)_2$。

3、糖-胨-酵培养基：葡萄糖20 g，蛋白胨10 g，酵母粉5 g，琼脂20 g，蒸馏水1 000mL。

4、抗性培养基：以PDA为基础培养基,添加$Pb(NO_2)_2$或$CdCl_2$，均为分析纯。培养基铅的浓度梯度为250、500、750、1 000 mg·L^{-1}[以$Pb(NO_2)_2$计]，镉的浓度为25、50、75、100 (以$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$计)。

5、吸附培养基：以PDA为基础培养基,添加$Pb(NO_2)_2$或$CdCl_2$，均为分析纯。液体培养基铅的浓度为250 mg·L^{-1} [以$Pb(NO_2)_2$计]，镉的浓度为50 mg·L^{-1} (以$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$计)，铅、镉混合培养基含250 mg·L^{-1} Pb和50 mg·L^{-1} Cd。

1.1.2 酵母菌的分离、纯化

试验以麻疯树两年生健康实生苗、珙桐两年生健康实生苗的根和茎段为材料,材料经自来水冲洗后用 0.5%的升汞浸泡 3min，用无菌水漂洗 4 次，再用 75%的乙醇浸泡 1min，无菌水冲洗数次(邵爱娟, 2001)。把处理过的材料置于筛选培养基内，30 ℃生化培养箱中黑暗培养 10 d。试验共设两个空白对照。最后一次漂洗液涂布于 PDA 培养基平板上作为对照。将表面灭菌处理的茎段、根压入马铃薯葡萄糖培养基平板内，使表面灭菌材料与 PDA 培养基接触 2 min，移去灭菌植物材料作为另一对照(王利娟, 2006)。待组织下或边缘的培养基上长出菌落后，于 PDA 培养基上采用划线稀释法进行菌种的分离纯化。

1.1.3 酵母菌的鉴定

将筛选到的菌株接种在糖-胨-酵培养基上，30 ℃黑暗培养5 d后观察菌落的形态,酵母菌用乳酸酚棉蓝染色液染色后在数码显微摄像系统下观察菌的形态并照相。采用酵母菌微量生化反应管(杭州天和微生物试剂有限公司)反应后进行酵母菌生理生化特征鉴定。

1.1.4 酵母菌铅、镉抗性及吸附性测定

试验前，用 PDA 培养基活化菌种，将供试菌接种到斜面抗性培养基上，每个浓度 3 个斜面，放入 30 ℃生化培养箱中黑暗培养,一周后观察斜面上菌落的生长情况。将 3 种酵母菌分别接入吸附培养的液体培养基中,同时做空白试验,接菌后的三角瓶放入恒温振荡器中 30 ℃, 137 r·min^{-1} 振荡培养 7 d。试样用硝酸酸化至 pH 1~2，用中速滤纸过滤，滤液用硝酸和高氯酸消解，消解完成后消解液用火焰原子吸收分光光度法测定铅和镉的浓度。

铅和镉的吸附率采用公式：吸附率(RE)=(初始浓度-终浓度)/初始浓度×100%进行计算。

1.2 接种酵母菌的麻疯树幼苗在铅、镉胁迫下的生长

1.2.1 供试土壤

试验用土壤采自西昌学院北校区校园内林地边缘表层土壤，其理化性质为：pH 值 6.10（水），有效磷浓度 6.29 mg·kg^{-1}，水解性氮浓度 170.84 mg·kg^{-1}，有效钾浓度 787.16 mg·kg^{-1}，有机质浓度 12.34 mg·kg^{-1}，Pb 浓度 49.7 mg·kg^{-1}，Cd 浓度 0.94 mg·kg^{-1} 。供试土壤试验前用 500 mg·kg^{-1} Pb[以 $Pb(NO_2)_2$ 计]和 50 mg·kg^{-1} Cd（以 $CdCl_2 \cdot 5H_2O$ 计）（Pb500-Cd50）处理，老化至少两周可移植麻疯树幼苗。

1.2.2 酵母菌的活化及接种

采用固体培养基活化菌种后，将活化后的菌接种到 PDA 液体培养基中，恒温振荡器中振荡培养一周，培养温度 30 ℃，转速 100 r·min^{-1},以不接菌的培养基作为对照，摇菌 7 d 的菌液用于做接菌试验。

将麻疯树种子播种在盛有育苗基质（育苗基质经 121 ℃高温高压灭菌 2 h）的塑料钵内（种子用 1%高锰酸钾浸泡 1 h 后再用自来水冲洗），每钵 5 粒种子。菌种培养 1 周后，用灭菌后的纯水将培养液稀释 5 倍后，浇灌已经开始萌发麻疯树种子，每种菌设 6 个重复，对照

用培养过的 PDA 对照培养基稀释 5 倍后浇灌。一周后再浇灌一次菌液。幼苗经接种处理 30 d 后移栽到铅、镉处理后的土壤中。

1.2.3 植株的培养

采用盆栽试验法，将接菌后的麻疯树幼苗移栽到 Pb500-Cd50 处理后的土壤中，每钵 3 株，每种菌 5 钵，试验期间根据水分状况适当补充水分。接菌和幼苗培养试验均在人工气候箱内完成，人工气候箱的温度为 30 ℃，光照时间为 16 h，湿度为 50%。

1.2.4 麻疯树幼苗相关生化指标的测定

幼苗处理后的 30 d 采样，接种每种菌的植株选取 6 株分为 3 组，将每组植株的根、茎、叶剪下并测其鲜重，将根、茎、叶分别放入恒温干燥箱 105 ℃杀青 30 min 后于 80 ℃烘干，取出分别测其干重。

将每处理烘干后的根、茎、叶分别混合，粉碎过筛后用于氮、磷浓度的测定。磷浓度的测定采用钼锑抗比色法（李会娟，2012），氮浓度的测定采用奈氏比色法（McDonald, 1978）。剩余植株的倒 2 叶或倒 3 叶，用于分析其他生理指标。叶绿素的浓度的测定采用丙酮乙醇混合提取法（李合生，2003）。丙二醛浓度的测定采用硫代巴比妥酸 TBA 法（李合生，2003），CAT 活性的测定采用过氧化氢比色法（Aebi，1984），POD 活性的测定采用愈创木酚法（Lagrimini,1991），SOD 活性的测定采用氮蓝四唑（NBT）法（Beauchamp & Fridovich，1971），总铅和总镉浓度的测定采用原子吸收分光光度法（张辉和唐杰，2011）。

2 结果与分析

2.1 铅、镉吸附菌的筛选、鉴定、抗性测定

本试验从初筛培养基中共筛选出 3 种酵母菌。三种酵母菌分别来自于麻疯树的根段(暂命名为 Jc)、珙桐的茎段（暂命名为 Di1)、珙桐的根段（暂命名为 Di2)。

2.1.1 铅、镉吸附酵母菌的鉴定

2.1.1.1 形态学特征

Jc 菌落表面成粉红色，表面湿润粘稠(图 1：a)，此菌在显微镜下呈蓝色椭圆状(图 1：b)，经初步观察，初步鉴定属于红酵母属，形状为圆形或椭圆状,菌落呈红色。Di1 菌落表面呈纯白色，菌落中间有凸起，表面呈绒毛状(图 1：c)，此菌在显微镜下呈蓝色长椭圆形(图 1：d)。Di2 菌落表面呈乳白色，粉质状(图 1：e)，此菌在显微镜下呈蓝色椭圆状(图 1：f)。

2.1.1.2 生化特征鉴定

利用酵母菌微量生化反应管对 3 种酵母菌进行生理生化特征鉴定，参照《酵母菌的特征与鉴定手册》(Barnett et al,1983；胡瑞卿译，1990)，通过形态学和生理生化特征的分析，鉴定的结果见表 1。Jc 初步鉴定为红酵母属（*Rhodotorula* sp.）的流散红酵母，Di1 为假丝酵母属(*Candida* sp.）的烃延胡索酸假丝酵母，Di2 为德巴利酵母属(*Debaryomyces* sp.）的卡斯特德巴利酵母。

2.1.2 三种酵母菌的对铅、镉的抗性分析

由表 2 可知，三种酵母菌均能在 500 mg·L^{-1} Pb 和 50 mg·L^{-1} Cd 下生长。其中 Jc 的铅和镉的抗性最强，分别能在 1 000 mg·L^{-1} Pb 和 200 mg·L^{-1} Cd 下生长。Di2 能在 1 000 mg·L^{-1} Pb 和 100 mg·L^{-1} Cd 下生长。结果表明，三种酵母菌对铅、镉都有一定的抗性，其抗性能力的大小为 Jc>Di2>Di1。

2.1.3 三种酵母菌对铅、镉吸附性的分析

三种酵母菌对铅和镉均有一定的吸附性。Di2 和 Jc 对铅有较高的吸附率，Di1 吸附铅的量与 Di2 和 Jc 存在明显差异(表 3)。Di2 虽然能在 Cd^{2+} 50 mg·L^{-1}，或 250 mg·L^{-1} Pb 和 50 mg·L^{-1} Cd 的液体培养基中生长，但是对 Cd 的吸附率非常低，在混合培养液中几乎不能吸附 Cd。Di1 和 Jc 对 Cd、Pb 具有一定的吸附性，Jc 对 Cd 的吸附性明显高于 Di1 对 Cd 的吸附性,二者对

Pb 的吸附性无显著差异（表 3)。铅镉吸附性的试验表明：Jc 和 Di1 对铅和镉都具有一定的吸附性，而 Di2 对 Cd 的吸附性几乎为 0。因此本试验筛选出 Di1 和 Jc 作为菌种，接种到麻疯树幼苗中，并做盆栽试验观察接种两种酵母菌后的麻疯树植株对铅、镉胁迫的响应。

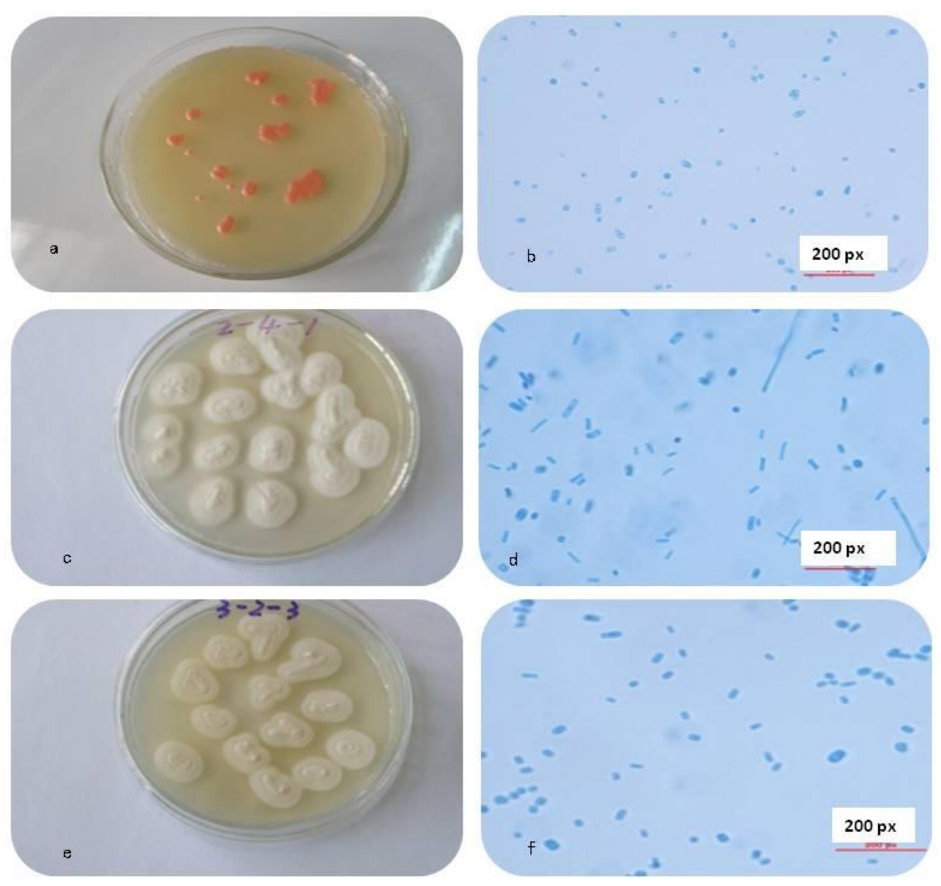


图 1 三种酵母菌菌落的形态(a，c，e)和菌的形态(40x10 倍）(b，d，f)

Fig 1 Characteristics of colony (a), (c), (e) and the form(b) , (d), (e) of three yeasts

表 1 3 种酵母菌生理生化特征鉴定

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of three yeasts

试验 Test		Jc	Di1	Di2	试验 Test		Jc	Di1	Di2
发酵试验 Fermentation test	葡萄糖 Glucose	-	+	+	同化试验管 Assimilation test	葡萄糖 Glucose	+	+	+
	麦芽糖 Maltose	-	+	+		麦芽糖 Maltose	+	+	+
	半乳糖 Galactose	-	+	+		蔗糖 Sucrose	+	+	+
	乳糖 Lactose	-	-	-		乳糖 Lactose	-	+	+
	蔗糖 Sucrose	-	-	-		蕈糖 Trehalose	+	+	+
生化试验 Biochemical test	尿酸 Triketo purine	-	-	-		肌醇 Inositol	-	+	-
	硝酸盐 Nitrate	+	-	-		卫矛醇 Galactitol	+	+	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

Note: “+”means positive; “-”means negative.

2.2 接种酵母菌的麻疯树植株在铅、镉胁迫下的生长情况

2.2.1 不同接菌处理对麻疯树植株生物量的影响

麻疯树植株经 Di1 和 Jc 接菌处理后，其鲜重和干重的变化见表 4。与不接种酵母菌(ck)的麻疯树相比，接种 Di1 和 Jc 的麻疯树植株根、茎、叶、全株鲜重显著增加，在接种 Di1 和 Jc 后根鲜重分别提高了 29%和 35%；茎鲜重分别提高了 38%和 47%；叶鲜重分别提高了 74%和 78%；全株鲜重分别提高了 49%和 56%。

与不接种酵母菌(ck)的麻疯树相比，接种 Di1 和 Jc 的麻疯树植株根、茎、叶、全株干重显著增加，在接种 Di1 和 Jc 后根干重分别提高了 8%和 27%；茎干重分别提高了 30%和 39%；叶干重分别提高了 32%和 55%；全株干重分别提高了 29%和 44%。这说明接种 JC 和 Di1 后促进了铅、镉胁迫下麻疯树的生长。

表 2　3 种酵母菌对铅、镉的抗性

Table 2　Resistance on lead、cadium of three yeasts

菌种　Strains	Pb (mg·L^{-1})				Cd (mg·L^{-1})			
	250	500	750	1 000	50	100	150	200
Jc	+	+	+	+	+	+	+	+
Di1	+	+	-	-	+	-	-	-
Di2	+	+	+	+	+	+	-	-

注：“+”表示能生长，“-”表示不能生长。

Note: “+”means it could grow ；“-”means it couldn’t grow.

表 3　不同酵母菌对铅(a)和镉(b)的吸附率

Table 3 Adsorption rate on lead(a) and cadium(b) of different yeasts

菌种　Strains	铅 Pb^{2+}		镉 Cd^{2+}	
	铅溶液 Pb^{+} solution	铅镉混合液 Pb^{2+}+ Cd^{2+} solution	镉溶液 Cd^{2+} solution	铅镉铅镉混合液 Pb^{2+}+ Cd^{2+}solution
Di2	51.09±2.76a	24.47±2.94a	9.73±1.40a	1.77±1.53a
Di1	30.24±3.61b	10.01±1.11b	35.69± 0.81b	13.24±2.34b
Jc	43.80±2.76a	20.02±1.11a	45.42±0.81c	30.89±1.53c

注：相同字母表示差异不显著。下同

Note：Means with the same letter in the columns are not significantly different at $P \le 0.05$ according to the LSD test. The same below.

2.2.2 不同接菌处理对麻疯树植株叶绿素及氮和磷浓度的影响

接种 Di1 和 Jc 后的麻疯树植株叶绿素 a，叶绿素 b，叶绿素 a+b 及胡萝卜素浓度显著增加（表 4），　在接种 Di1 和 Jc 后植株叶片叶绿素 a 的浓度分别提高了 46.3%和 46.8%；叶绿素 b 的浓度分别提高了 66%和 55%；叶绿素 a+b 的浓度分别提高了 50%和 48%；类胡萝卜素的浓度分别提高了 28%和 44%；同时由于叶绿素 b 浓度增加的比例增大，导致叶绿素/类胡萝卜素分别增加了 8.5%和 4.4%；叶绿素 a/叶绿素 b 分别下降了 9.7%和 13.6%。

接种 Di1 和 Jc 后的麻疯树植株根、茎、叶和全株中氮和磷的浓度显著增加（表 4）。在接种 Di1 和 Jc 后氮的浓度在根中分别增加了 36.7%和 86.9%；茎中分别增加了 18.8%和 62.5%；叶中分别增加了 20.7%和 64.6%；全株分别增加了 57.84%和 145.22%。在接种 Di1 和 Jc 后磷的浓度在根中分别增加了 35.9%和 60.7%；茎中分别增加了 46.1%和 63.3%；叶中分别增加了 5.5%和 6.3%；全株分别增加了 56.3%和 86.7%。

2.2.3 不同接菌处理对麻疯树植株铅和镉浓度的影响

接种 Di1 和 Jc 后的麻疯树植株根、茎、叶中铅和镉的浓度显著降低（表 4）。接种 Di1 和 Jc 后铅的浓度在麻疯树根中分别减少了 20.1%和 27.9%；茎中分别减少了 22.5%和 25.9%；叶中分别减少了 33.5%和 34.3%。接种 Di1 和 Jc 后镉的浓度在麻疯树根中分别减少了 23.9%和 29.5%；茎中分别减少了 18.8%和 25.2%；叶中分别减少了 31.5%和 33.5%。但接种 Di1 和 Jc 后的麻疯树全株中铅和镉的浓度与对照相比无显著差异。

2.2.4 不同接菌处理对麻疯树植株酶和非酶的抗氧化物质的影响

经 Di1 和 Jc 接菌处理的麻疯树提高了抗氧化酶 SOD，POD，CAT 的活性，Di1 接种后的麻疯树与对照相比，三种抗氧化酶的活性均显著提高，脂过氧化产物丙二醛的浓度显著降低（表 5）。在接种 Di1 和 Jc 后植株叶中丙二醛的浓度分别下降了 55.34%和 43.59%；过氧化氢酶 CAT 的活性分别提高了 23.9%和 11.8%；过氧化物酶 POD 的活性分别提高了 10.8%和 18.3%；超氧化物歧化酶 SOD 的活性分别提高了 129.8%和 49.0%。接种 Di1 对后麻疯树的抗氧化性明显提高，尤其是 SOD 的活性，比对照增加了 1.29 倍。

表 4　接种酵母菌的麻疯树植株在 Cd50-Pb500 胁迫下生长的生化指标

Table 4 Physiological parameter of *Jatropha curcas* seedlings inoculated yeasts under Cd50-Pb500 stress

生理参数 Physiological parameter	不同处理 Different treaments		
	Dil	Jc	对照 Control
鲜重 Fresh biomass			
根 Roots (g)	1.169±0.090b	1.226±0.064b	0.903±0.045a
茎 Shoots (g)	8.714±0.197b	9.235±0.370c	6.271±0.148a
叶 Leaves (g)	5.660±0.624b	5.812±0.691b	3.249±0.097a
全株 Whole plants (g)	15.543±0.545b	16.273±0.861b	10.423±0.223a
干重 Dry biomass			
根 Roots (g)	0.191±0.007a	0.224±0.004b	0.176±0.005a
茎 Shoots (g)	1.058±0.046b	1.128±0.046b	0.811±0.033a
叶 Leaves (g)	0.940±0.030b	1.097±0.068b	0.707±0.029a
全株 Whole plants (g)	2.189±0.067b	2.449±0.098c	1.694±0.052a
叶绿素浓度 concentration of photosynthetic pigments			
叶绿素 a　Chl a (mg g^{-1})	1.970±0.053b	1.976±0.089b	1.346±0.127a
叶绿素 b　Chl b (mg g^{-1})	0.743±0.014b	0.694±0.034b	0.445±0.039a
叶绿素 a+b　Chl a+b (mg g^{-1})	2.693±0.102b	2.661±0.197b	1.791±0.288a
类胡萝卜素 Car (mg g^{-1})	0.328±0.020b	0.370±0.013b	0.255±0.024a
叶绿素/类胡萝卜素 Chl/Car	7.621±0.130b	7.330±0.093ab	7.021±0.013a
叶绿素 a/叶绿素 b　Chla/Chlb	2.727±0.079b	2.884±0.033ab	3.020±0.028a
氮浓度 Concentration of nitrogen			
根 Roots (mg g^{-1})	25.15±0.62b	34.40±2.07c	18.40±0.40a
茎 Shoots (mg g^{-1})	17.12±1.30b	23.41±3.46ab	14.41±0.74a
叶 Leaves (mg g^{-1})	42.16±0.84b	57.49±0.74c	34.94±0.41a
全株 Whole plants (mg $plant^{-1}$)	31.273±1.603b	48.584±3.903c	19.812±1.132a
磷浓度 Concentration of phosphorus			
根 Roots (mg g^{-1})	4.569±0.064b	5.398±0.059c	3.360±0.095a
茎 Shoots (mg g^{-1})	5.134±0.243b	5.740±0.076c	3.513±0.155a
叶 Leaves (mg g^{-1})	8.664±0.128ab	8.731±0.154b	8.210±0.108a
全株 Whole plants(mg $plant^{-1}$)	7.224±0.388b	8.630±0.645c	4.622±0.265a
铅浓度 Concentration of Pb			
根 Roots (mg g^{-1})	67.245±1.043b	60.658±1.274b	84.153±1.406a
茎 Shoots (mg g^{-1})	16.583±0.798b	15.872±0.928b	21.411±0.753a
叶 Leaves (mg g^{-1})	10.458±0.457b	10.325±0.637b	15.728±0.794a
全株 Whole plants(mg $plant^{-1}$)	40.231±1.330a	42.813±2.452a	43.253±1.974a
镉浓度 concentration of Cd			
根 Roots (mg g^{-1})	52.459±0.981b	48.586±1.151b	68.907±1.072a
茎 Shoots (mg g^{-1})	10.089±0.776b	9.295±1.135b	12.424±0.739a
叶 Leaves (mg g^{-1})	5.215±0.919b	5.063±0.936b	7.609±0.342a
全株 Whole plants(mg $plant^{-1}$)	25.605±0.711a	26.918±1.436a	27.548±1.188a

表 5 接种酵母菌的麻疯树植株在 Cd50-Pb500 胁迫下抗氧化酶的活性及 MDA 的浓度

Table 5 Activities of enzymatic antioxidants and content of MDA of *Jatropha curcas* seedlings inoculated yeasts under Cd50-Pb500 stress.

处理 Treatments	丙二醛 MDA (mg g^{-1})	SOD (U g^{-1} FW)	POD (U min^{-1} g^{-1} FW)	CAT (U min^{-1} g^{-1} FW)
Di1	17.81±0.95c	212.59±16.09b	724.23±23.24b	17.96±1.40b
Jc	22.50±1.26b	137.84±15.01a	426.23±3.08a	16.21±0.34ab
对照 Control	39.88±0.56a	92.49±9.17a	360.15±37.31a	14.49±0.30a

3 讨论与结论

复合污染 Cd50-Pb500 对麻疯树表现出毒性效应，抑制了麻疯树的生长，降低了根、茎、叶的鲜重和干重（Liang et al., 2012）。试验中，我们发现与不接种酵母菌的麻疯树相比，接

种 Di1 和 Jc 的麻疯树植株根干（鲜）重、茎干（鲜）重、叶干（鲜）重、全株干（鲜）重显著增加，说明接种 Di1 和 Jc 菌后减弱了复合污染 Cd50-Pb500 对麻疯树的毒性，促进了麻疯树植株的生长。麻疯树植株铅和镉浓度测定的结果表明：接种 Di1 和 Jc 菌后，麻疯树植株根、茎、叶中铅和镉的浓度显著低于对照，但是由于根、茎、叶的干重增加，接菌后麻疯树植株全株铅镉浓度与对照并无显著差异。通过进一步的试验，我们发现 Di1 和 Jc 菌并没有侵染到麻疯树幼苗的根内，但由于在幼苗移栽的过程中根部带有少量的育苗基质（Di1 和 Jc 菌作为麻疯树的根际菌而被转移到铅、镉污染的土壤），因此 Di1 和 Jc 菌可能作为优良的铅和镉的钝化剂，使铅和镉在土壤中沉淀或被吸附固定，改变土壤中铅、镉的存在状态，“钝化”其生物有效性，从而降低麻疯树对铅、镉的吸收，促进麻疯树的生长。植物促生细菌作为优良的重金属钝化剂，可以改变根际微环境中重金属元素生物有效性，促进植物生长，调控植物对重金属的吸收和富集效率（Babu et al., 2015；韩辉等，2019）。因此 Di1 和 Jc 菌亦可作为铅和镉的钝化剂，阻控作物吸收重金属，促进作物生长。

氮和磷是植物必需的两种大量元素，铅和镉对植物的毒性还包括导致氮和磷的吸收、转运受阻，植物体中的氮和磷吸收减少(Ramón et al.,2003；Kibria et al.,2009；Farouk et al.,2011)。接种 Di1 和 Jc 菌后，由于其对麻疯树周围土壤铅和镉的钝化，减弱了其对麻疯树植株的毒害效应，麻疯树植株对氮和磷的吸收、转运增加。因此与对照相比，接种 Di1 和 Jc 后麻疯树植株根、茎、叶和全株中氮和磷的浓度显著增加。

铅和镉的毒性效应还表现在通过诱导氧自由基产生或通过降低抗氧化酶的活性，产生氧化性压力（Benavides et al., 2005），破坏细胞壁、质膜、线粒体和叶绿体等细胞器（Liang et al., 2012）。活性氧自由基包括超氧自由基（$O_2\cdot$）或（OH·）是植物正常代谢的一种副产物，正常植物能产生一种抗氧化系统来清除这些自由基。但是当植物受到胁迫的时候，这些自由基就会增多。活性氧的累积是由于 ROS 的产生和 ROS 清除的平衡的改变而引起的（Mittler, 2002），丙二醛（MDA），是不饱和脂肪酸氧化的最终产物,其浓度常常作为脂过氧氧化损伤程度的标志（Zhang et al., 2009）。麻疯树作为铅镉的抗性植物，可以通过提高抗氧化酶 SOD，POD，CAT 的活性清除自由基来提高对铅镉的抗性，但高浓度的铅镉如 Cd50-Pb500 胁迫下，抗氧化酶 SOD，POD，CAT 的活性相较于 Cd50 和 Pb500 处理反而有所下降（Liang et al., 2012）。与对照相比，经 Di1 和 Jc 接菌处理的麻疯树叶片中铅和镉的浓度显著下降，减弱了铅镉对麻疯树叶片的氧化性损伤，同时抗氧化酶 SOD，POD，CAT 的活性显著提高，清除了更多的自由基，说明 Di1 和 Jc 接菌处理的麻疯树叶片体内的自由基减少，自由基对植物的氧化性损伤降低，可由丙二醛的浓度显著下降反应出来。

复合污染 Cd50-Pb500 对麻疯树的毒性效应还表现在显著降低了光合色素的浓度，其中叶绿素 b 下降程度更为明显，导致叶绿素 a/叶绿素 b 增加，叶绿素/类胡萝卜素比例下降（Liang et al., 2012）。与对照相比，经 Di1 和 Jc 接菌处理的麻疯树叶片中叶绿素 a 和叶绿素 b 浓度显著增加，叶绿素 a/叶绿素 b 显著下降，叶绿素/类胡萝卜素比例增加。经 Di1 和 Jc 接菌处理的麻疯树叶片中叶绿素浓度增加可能是由于增加了植株对氮元素的吸收（Farouk et al., 2011）。

该研究从珙桐的茎段和麻疯树的根部分离出了两种对铅镉具有吸附效应的酵母菌 *Rhodotorula* sp. （Jc）和 *Candida* sp. （Di1），这两种酵母菌可以与麻疯树根系以及土壤形成特殊根际微环境，降低土壤中铅和镉生物有效性，减弱高浓度铅和镉复合污染对麻疯树植株的毒性效应，促进了麻疯树的生长，增加了麻疯树在重金属修复方面的应用前景。

参考文献：

AEBI H, 1984. Catalase in vitro[J]. Method Enzymol. 105:121-126.
BABU AG, SHEA PJ, SUDHAKAR D, et al., 2015. Potential use of Pseudomonas koreensis AGB-1 in association with Miscanthus sinensis to remediate heavy metal(loid)-contaminated mining site soil [J]. J Environ Manag, 151: 160-166.
Hu RQ, 1983.Yeasts: Characteristics and identification[M]. Qingdao: Qingdao Ocean Univ Pr: 34;36;45;76-79;112-115;164-167.[胡瑞卿，1990.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛：青岛海洋大学出版社:34;36;45;76-79;112-115;164-167.]

BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Anal Biochem, 44(1):276-287.
BENAVIDES MP, GALLEGO SM, TOMARO ML, 2005. Cadmium Toxicity in Plants[J]. Braz J Plant Physiol, 17(1): 21-34.
BHARGAVA A, CARMONA FF, BHARGAVA M, et al., 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals[J]. J Environ Manag, 105:103-20.
CLOETE KJ, VALENTINE AJ,STANDER MA ,et al., 2009. Evidence of symbiosis between the soil yeast Crytococcus laurentii and as clerophyllous medicinal shrub,*Agathosma betulina* (Berg.) Pillans[J]. Microb Ecol, 57:624-632.
DENG Z, WANG W, TAN H, et al., 2012. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapes (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils[J]. Water Air Soil Poll, 223:5321-5329
FAROUK S, MOSA A, TAHA A, et al., 2011. Protective effect of humic acid and chitosan on radish *(Raphanus sativus*, L. var. sativus) plants subjected to cadmium stress[J]. J Stress Physiol Biochem,7(2):99-116
FOIDL N, FOIDL G, SANCHEZ M, et al.,1996. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua[J]. Bioresour Technol,58(1):77-82.
GREB B, OLSEN S, 1967. Organic phosphorus in calcareous Colorado soils[J]. Soil Sci Soc Am J, 31(1):85-89.
HAN H, WANG XY, CAI H, et al., 2019. Isolated of heavy metal immobilized and plant growth-promoting bacteria and its effects on reducing heavy metal accumulation in wheat[J]. Environ Sci, 7:1-15.[韩辉,王晓宇,蔡红,等,2019.重金属固定植物促生细菌的筛选及其阻控小麦富集重金属效应[J].环境科学, 7:1-15.]
JAMIL S, ABHILASH PC, SINGH N, et al., 2009. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash[J]. J Hazard Mater, 172(1):269-75.
KIBRIA MG , ISLAM M , OSMAN KT, 2009. Effects of lead on growth and mineral nutrition of *Amaranthus gangeticus* L. and *Amaranthus oleracea* L.[J]. Soil Environ, 28(1): 1-6.
LAGRIMINI LM, 1991.Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase[J]. Plant Physiol, 96(2):577-83.
LI HJ, 2012.Comparative study on determination of phosphorus content in two kinds of plants[J]. Mod Agric Sci Technol, 11:16-17 [李会娟, 2012. 2 种植物磷浓度的检测方法比较研究[J].现代农业科技, 11:16-17.]
LI HS, 2000.The principle and measuring technique of plant physiology and chemistry[M]. Beijing: Beijing Higher Education Press：134-137;195-197;260-261.[李合生，2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京：北京高等教育出版社:134-137;195-197;260-261.]
LIANG J，YANG ZH，TAN L, et al., 2012. Growth performance and tolerance responses of jatropha (*Jatropha curcas*) seedling subjected to isolated or combined cadmium and lead stresses[J]. Int J Agric Biol, 14: 861– 869
LI YS, FENG CL, WU XF, et al., 2015．A review on the functions of microorganisms in the phytoremediation of heavy metal-contaminated soils[J]．Acta Ecol，2015，35(20) : 6881-6890．[李韵诗，冯冲凌，吴晓芙，等, 2015．重金属污染土壤植物修复中的微生物功能研究进展[J]．生态学报, 35(20):6881-6890.]
MANGKOEDIHARDJO S, 2008. *Jatropha curcas* L. for phytoremediation of lead and cadmium polluted soil[J]. World Appl Sci J, 4(4):519-522.
MCDONALD M, 1978. A simple and improved method for the determination of microgram quantities of nitrogen in plant material[J]. Ann Bot, 42(2):363-366.
MITTLER R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends Plant Sci, 7(9):405-10.
NASSAR AH, EL-TARABILY KA, SIVASITHAMPARAM K, 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast Williopsis saturnus endophytic in maize Zea m ays L.) roots[J]. Biol Fert Soils, 42, 97–108 .
PANDEY VC, BAJPAI O, SINGH N, 2016. Energy crops in sustainable phytoremediation[J]. Renew Sust Energ Rev, 54:58-73.
RAMON OC, SAUL V, ESTEBAN E, et al. , 2003. Cadmium-stress in white lupine: Effect on nodule structure and function[J]. Plant Physiol, 161: 911-919.
SHAO AJ, LIN SF, ZHANG SJ, et al., 2001. Isolation of a kind of endophytic fungus which can produce toxol compounds[J]. Acta Acad Med Sin, 23(6):642-644.[邵爱娟，林淑芳，张思巨，等, 2001.一种能产生紫杉醇类化合物内生真菌的分离[J]．中国医学科学院学报, 23(6):642-644.]
TCHOUNWOU PB, YEDJOU CG, PALLOLLA AK, et al., 2012. Heavy metal toxicity and the environment[J]. Exp Suppl, 101: 133- 164
WANG LJ, HE XS, 2006. Research methods of the isolation and sublimation of plant endophytical fungi[J]. J

Microbiol, 26 (4): 55- 60.[王利娟, 贺新生, 2006. 植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. 微生物学杂志, 26 (4): 55- 60.]
WONG JWC, SELVAM A, 2006. Speciation of heavy metals during co-composting of sewage sludge with lime[J]. Chemosphere, 63:980–986
XIN G, GLAWE D, DOTY SL, 2009. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees[J]. Mycolog Res, 11(3): 973– 980.
Zhang H, Tang J, 2011. Determination of Fe, Mn, Cu, Pb and Cd in vegetables by atomic absorption spectrometry[J]. Chin J Spectrosc Lab, 28(1):72-74[张辉, 唐杰, 2011. 原子吸收光谱法测定蔬菜中的铁、锰、铜、铅和镉[J]. 光谱实验室, 28(1):72-74.]
Zhang SS, Zhang HM, Qin R, et al., 2009. Cadmium induction of lipid peroxidation and effects on root tip cells and antioxidant enzyme activities in *Vicia faba* L.[J]. Ecotoxicology, 18(7):814-823